

金针菇接种过程中环境微生物含量与污染率的曲线拟合分析

张鹏¹, 刘雅晴², 熊炳辉³, 赵光辉⁴, 蓝波妙¹, 林金秀¹, 陈朝文¹, 庄卫东^{1*}

(1. 泉州市农业科学研究所, 福建泉州 362212; 2. 泉州师范学院, 福建泉州 362046; 3. 福建省裕兴农业科技有限公司, 福建泉州 362212; 4. 福州市农业科学研究所, 福建福州 350018)

摘要 采用自然沉降法对一家企业接种箱进行杂菌含量测定, 利用回归分析法对环境中杂菌含量和污染率进行线性回归、二次曲线回归、三次曲线回归, 并对得到的回归模型进行检验, 研究金针菇菌包污染率随接种环境中杂菌含量变化的规律。结果表明, 3种模型的 P 值均小于 0.01, 说明 3 种模型均可以很好地反映环境中杂菌含量与污染率的关系, 三次曲线模型的 R_{adj}^2 值最大(0.997), 接近 1, 且各回归系数达显著水平, 因此三次曲线模型最适合表征环境中杂菌含量与污染率的关系, 回归方程为 $Y=0.203-0.489x+0.293x^2-0.014x^3$ 。

关键词 回归分析法; 污染率; 线性回归; 二次曲线; 三次曲线

中图分类号 S646.1*5 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)04-0046-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.04.014



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Curve Fitting Analysis of Dynamics between Microbes Content and Contamination Rate during *Flammulina velutipes* Inoculating
ZHANG Peng¹, LIU Ya-qing², XIONG Bing-hui³ et al (1. Quanzhou Institute of Agricultural and Sciences, Quanzhou, Fujian 362212; 2. Quanzhou Normal University, Quanzhou, Fujian 362046; 3. Fujian Yuxing Agricultural Science and Technology Co. Ltd., Quanzhou, Fujian 362212)

Abstract In this paper, the law of variation of other microbes content in inoculated environment versus contamination rate of fungi bag has been studied. In order to achieve the objective of this study, natural sediment method was applied to measure other microbes content in inoculation box of one enterprise. Through regression analysis which contain linear, quadric curve and cubic curve on the date of other microbes content in inoculation box and contamination rate, the mathematical model was constructed, and then a statistical test was put to the model. The results showed that the P value of the three models were less than 0.01, all of the model well reflected the relationship between other microbes content and contamination rate, the R_{adj}^2 of cubic model was maximal(0.997) and regression coefficient were distinctness by T testing, therefore, the cubic model can accurately predict the change of the contamination rate according to other microbes content, regression equation was $Y=0.203-0.489x+0.293x^2-0.014x^3$.

Key words Regression analysis method; Contamination rate; Linear regression; Quadric curve; Cubic curve

金针菇(*Flammulina velutipes*)又名金菇、构菌、毛柄金钱菌, 隶属于伞菌目(Agaricales)白蘑科(Tricholomataceae)小火焰属(*Flammulina*)^[1-2], 其营养丰富, 深受市场欢迎, 是我国最早进行人工^[3-5]栽培的食用菌之一, 我国食用菌协会统计显示, 2017年我国金针菇产量达 247.92 万 t。目前我国金针菇主产区福建、江苏等地已实现了工厂化栽培, 对于生产企业而言, 污染率是决定企业经济效益的重要因素之一, 在工厂化栽培过程中, 各个操作空间及环境的洁净度与菌包的污染率呈显著正相关, 为了减少污染发生, 接种室、培养车间的杂菌需要控制在一定的范围内, 目前许多金针菇生产企业尤其是袋栽模式的企业仍采用传统的接种箱接种, 接种箱内的洁净度直接关系到接种的成功率, 做好接种箱的消毒及空间杂菌监测极为重要。检查环境空气中微生物数量的方法很多, 沉降法是其中的一种, 沉降法操作简单, 检查出的活菌总数客观地反映了空气污染的程度, 是判断空气污染的指标之一, 常用于室内空气微生物含量测定与评价^[6-7]。笔者从一家金针菇生产企业的接种环节入手, 对接种箱内微生物采样, 研究接种过程中杂菌含量与污染率的关系, 分析两者之间的数量关系, 建立合适的模型, 旨在对菌包污染率进行预

测, 从而及时采取严格消毒措施, 降低污染率, 提高种植效益。

1 材料与方法

1.1 试验地点 福建省裕兴农业科技有限公司。

1.2 试验材料 PDA 培养基、接种箱、酒精灯等。

1.3 试验方法

1.3.1 采样点的选择。 每个接种箱设置 3 个采样点。采样点分布见图 1。

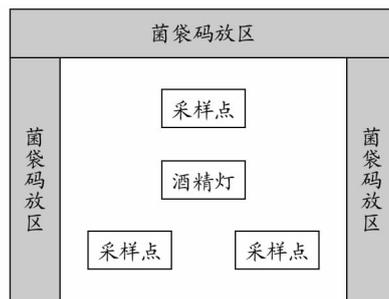


图 1 采样点分布

Fig.1 The distribution of sampling points

将接种工具、菌种、栽培袋按要求放置到接种箱内, PDA 平皿置于采样点处, 根据试验设计, 进行相应的处理后, 密封接种箱, 打开皿盖, 自然暴露在接种箱空气中 5 min 后盖上皿盖, 采样完成。采样完成后立即接种, 接种时按无菌操作要求进行^[8], 接种完成后培养袋连同平皿一起取出。接种室的环境温度控制在 20℃ 以内。

基金项目 泉州市科技计划项目(2018N055); 泉州省级农业科技园区建设(2017N2001)。

作者简介 张鹏(1985—), 男, 河北大名, 助理研究员, 硕士, 从事食用菌栽培与育种研究。* 通信作者, 教授级高级农艺师, 从事园艺学研究。

收稿日期 2019-07-17

将平皿倒置放入 35~37 ℃ 恒温培养箱中,培养 48 h 后取出,进行菌落形成单位计数,求出每箱平均每皿菌落形成单位的数量^[9]。

1.3.2 试验设计。接种环境微生物的含量通过控制接种箱内部消毒严格程度的方式来设置 6 个处理,处理①:严格按照规程操作,器物表面及空间消毒;处理②:气雾消毒 30 min,器物表面不作消毒;处理③:气雾消毒 15 min,器物表面不作消毒;处理④:不作气雾消毒,器物表面不作消毒;处理⑤:不作任何消毒措施,打开箱盖 10 min;处理⑥:不作任何消毒措施,打开箱盖 30 min。每个处理 4 个重复,每个重复 5 箱,每箱接种 60 袋。

1.3.3 数据统计。接种后的栽培袋移至培养室,21 ℃ 避光培养 10 d,统计污染率。记录每 10 个接种箱空气中杂菌含量(CFU/皿)的平均值及其对应的污染率。

1.3.4 数据分析。以上述空气中杂菌含量(CFU/皿)的平均值为自变量,其对应的污染率为因变量,绘制散点图。观察数据在图中的分布情况及特点,选用不同的回归模型对数据进行回归拟合,根据不同模型的 R 、 R^2 、 R^2_{adj} 、 F 等统计量判断

(接种箱)空气中杂菌含量与污染率这 2 个变量适用于哪个回归模型。

2 结果与分析

2.1 数据统计 (接种箱)空气中杂菌含量与污染率的统计结果见表 1,相应的散点图见图 2,不同处理的平板经培养后菌落生长情况见图 3。根据散点图的分布情况选择 3 个回归模型(表 2)。

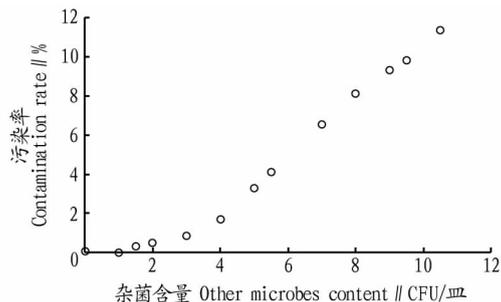


图 2 污染率散点图

Fig.2 Scatter plots of contamination rate

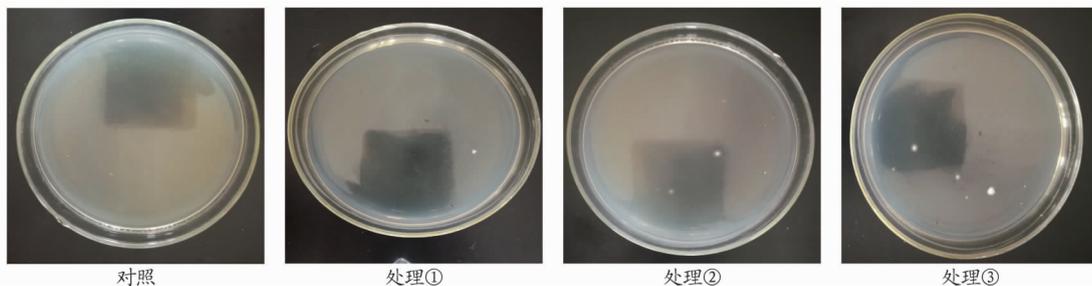


图 3 平板菌落

Fig.3 Plate bacterial colony

表 1 各接种箱的污染率

Table 1 Contamination rate in different treatments

| 处理 Treatment | 重复 Repeat | 杂菌含量 Other microbes content // CFU/m ³ | | | | | 平均杂菌含量 Average other microbes content CFU/m ³ | 接种袋数 Cultivate bags 袋 | 污染袋数 Contaminated bags // 袋 | 污染率 Contamination rate // % |
|-----------------|--------------|---|----|----|----|----|---|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | | | |
| CK | — | — | — | — | — | — | 0 | 10 000 | 6 | 0.06 |
| ① | 1 | 0 | 2 | 0 | 1 | 1 | 1 | 600 | 0 | 0.00 |
| | | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 600 | 2 | 0.32 |
| ② | 1 | 2 | 3 | 2 | 2 | 1 | 2.0 | 600 | 3 | 0.50 |
| | | 2 | 2 | 2 | 1 | 3 | 2.0 | 581 | 5 | 0.86 |
| ③ | 1 | 3 | 3 | 4 | 2 | 3 | 3.0 | 588 | 10 | 1.70 |
| | | 2 | 2 | 5 | 3 | 3 | 4.0 | 579 | 19 | 3.28 |
| ④ | 1 | 4 | 5 | 3 | 4 | 4 | 4.0 | 583 | 24 | 4.12 |
| | | 5 | 5 | 3 | 3 | 4 | 5.0 | 581 | 38 | 6.54 |
| ⑤ | 1 | 5 | 7 | 6 | 5 | 4 | 5.5 | 592 | 48 | 8.11 |
| | | 7 | 7 | 5 | 5 | 6 | 7.0 | 591 | 55 | 9.31 |
| ⑥ | 1 | 8 | 9 | 6 | 8 | 6 | 8.0 | 591 | 58 | 9.81 |
| | | 9 | 5 | 7 | 5 | 7 | 9.5 | 599 | 68 | 11.35 |
| | | 10 | 6 | 8 | 6 | 8 | | | | |
| | | 10 | 10 | 9 | 10 | 8 | | | | |
| | | 11 | 8 | 8 | 7 | 9 | | | | |
| | | 10 | 11 | 9 | 11 | 8 | | | | |
| | | 12 | 8 | 8 | 8 | 10 | | | | |
| | | 10 | 11 | 12 | 14 | 9 | | | | |
| | | 12 | 9 | 9 | 9 | 10 | | | | |

表2 模型选择
Table 2 Selected models

| 序号 No. | 模型名称 Models | 回归方程 Regression equation |
|-----------|----------------|-----------------------------|
| 1 | 一元线性 | $y=a+bx$ |
| 2 | 二次曲线 | $y=b_0+b_1x+b_2x^2$ |
| 3 | 三次曲线 | $y=b_0+b_1x+b_2x^2+b_3x^3$ |

2.2 不同模型比较及选择 不同模型的统计量描述及检验见表3。从表3可以看出,直线、二次曲线、三次曲线3种模型的拟合度(R^2)均达0.95以上,方差分析的Sig.均小于0.01,因此这3种模型的拟合结果均具有统计学意义。

三次曲线模型的 R_{adj}^2 最大(0.997),因此可以判断(接种箱)空气中杂菌含量与污染率这2个变量更适于Cubic模型,拟合曲线与观测值非常吻合(图4)。故Cubic模型最适合表征污染率随(接种箱)空气中杂菌含量变化的规律。从图4可以看出,当接种箱内空气中杂菌含量在0~3 CFU/皿时,菌包的污染率能够控制在1%的范围内,当杂菌含量超过3 CFU/皿时,菌包的污染率明显增大。

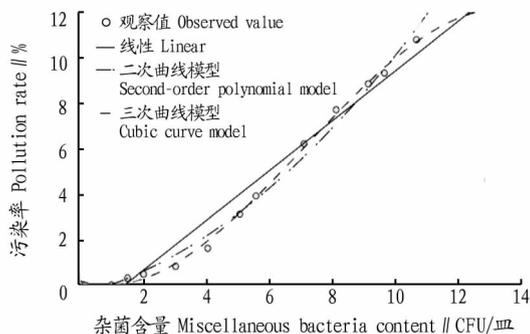


图4 拟合曲线

Fig.4 Fitted curve

表3 模型统计量及方差分析

Table 3 Selected models summaries and ANOVA

| 模型名称 Models | 模型描述 Models description | | | 方差分析 ANOVA | |
|----------------------|----------------------------|-------|-------------|---------------|-------|
| | R | R^2 | R_{adj}^2 | F | Sig. |
| 一元线性 Linear | 0.980 | 0.969 | 0.957 | 270.036 | 0.000 |
| 二次曲线 Quadratic curve | 0.995 | 0.990 | 0.988 | 494.892 | 0.000 |
| 三次曲线 Cubic curve | 0.999 | 0.998 | 0.997 | 1 516.205 | 0.000 |

表4 Cubic模型回归系数

Table 4 Regression coefficient in the cubic equation

| 变量 Variable | 非标准化系数 Non-standardized coefficient | | 标准化系数 Standardization coefficient | t | Sig |
|----------------|--|-------|--------------------------------------|--------|-------|
| | B | SEB | Beta | | |
| X | -0.489 | 0.161 | -0.408 | -3.030 | 0.014 |
| X_2 | 0.293 | 0.037 | 2.659 | 7.989 | 0.000 |
| X_3 | -0.041 | 0.002 | -1.289 | -6.049 | 0.000 |
| 常数 Constant | 0.203 | 0.185 | | 1.100 | 0.300 |

2.3 回归方程 Cubic模型的回归系数见表4,从表4可以看出,因变量Y(污染率)对3个自变量(接种箱杂菌含量) x 、

x^2 、 x^3 的非标准化回归系数分别为-0.489、0.293、-0.014,对应显著性检验的t值分别为-3.03、7.989、-6.049,3个回归系数B的显著性水平P值均小于0.05,可以认为自变量 x 、 x^2 、 x^3 对因变量(污染率)均有显著影响。自变量 x^2 的标准化回归系数最大,说明变量 x^2 较其他变量对因变量(污染率)的影响最大。因此,回归分析得到的回归方程为 $Y=0.203-0.489x+0.293x^2-0.014x^3$ 。

3 讨论

在金针菇的工厂化生产中,各个工艺环节的操作不当均会引起菌包的污染,保持正常的染菌率是食用菌工厂运行的基础,所有的管理工作都是建立在这个基础之上,如果染菌率失控,正常的生产秩序将完全被打乱,工厂将承受巨大的经济损失。接种过程中的污染主要来源于接种工具及悬浮空间内的微生物,包括真菌、细菌、病毒、放线菌等,通过对接种环境的动态检测,预测菌包的污染率,指导金针菇生产管理,及时控制环境质量,从而降低污染。通常,食用菌生产企业要将污染率控制在5%以下,效益才能得到保障,该研究根据Cubic模型可知,当接种箱内杂菌含量超过6 CFU/皿时,菌包的污染率将大于5%。生产中,可以对接种箱进行抽样检测,若箱内杂菌含量超过6 CFU/皿时,污染率过大,应对接种箱重新消毒,同时该批次菌包不能继续培养;若箱内杂菌含量小于5 CFU/皿时,则污染率在可以接受的范围内。

空气微生物的采样方法有很多,自然沉降法最简单、应用最广,它是利用带有微生物的尘粒因重力自然下降至培养基表面,在空气中暴露一定时间后进行培养,菌落检查计数,以平板培养皿中的菌落数来判定环境内的活微生物数。据测算,每100 cm²培养基在空气中暴露5 min,其表面接受自然沉降的杂菌相当于10 L空气中所含的杂菌数。

由于某些微生物不能在PDA培养基上生长^[10],检测过程中也容易受到其他环境因素的干扰,这种方法并不能精确地测出空气中全部微生物的真实含量,但能反映空气中微生物含量的变化趋势及严重情况,此外由于引起金针菇菌包污染的主要杂菌如木霉属、青霉属、根霉属、脉孢菌属、假单胞杆菌属等都可以在PDA培养基上生长,因此该方法可以用来对接种箱空气环境进行大致的估计。

参考文献

- [1] 张金霞.中国食用菌菌种学[M].中国农业出版社,2001:186-194.
- [2] 谢宝贵,江玉姬.金针菇遗传育种进展[A].中国菌物学会第三届会员代表大会暨全国第六届菌物学学术讨论会论文集[C].北京,2003:302-310.
- [3] 郭美英.中国金针菇生产[M].北京:中国农业出版社,2000:1-289.
- [4] 杨新美.中国食用菌栽培学[M].北京:中国农业出版社,1988:1-584.
- [5] 黄毅.食用菌栽培(第3版)[M].北京:高等教育出版社,2008:1-349.
- [6] 周园,肖纯凌,王岚,等.校园不同场所室内空气微生物分布的调查分析[J].中国医科大学学报,2011(05):412-416.
- [7] 李春青,昌艳萍,李红权,等.夏季校园室内空气微生物含量测定及评价[J].河南师范大学学报(自然科学版),2011(02):125-127.
- [8] 边银炳.食用菌栽培学[M].高等教育出版社,2017:105-107.
- [9] GB/T18204.3-2013 公共场所卫生检验方法 第3部分:空气微生物,2014.12.01.
- [10] 李燕.撞击法监测室内空气微生物稳定性研究[J].环境与健康杂志,2000,17(6):358.